

## BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

10/009629

HJ

EP 00/5258  
4

RECD 09 AUG 2000

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung

28/12

Aktenzeichen: 199 27 571.8  
 Anmeldetag: 17. Juni 1999  
 Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft,  
 Ludwigshafen/DE  
 Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit  
 erhöhtem Gehalt an Flavonoiden und pheno-  
 lischen Inhaltsstoffen  
 IPC: A 01 N 37/06

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
 sprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 06. Juli 2000  
 Deutsches Patent- und Markenamt  
 Der Präsident  
 Im Auftrag

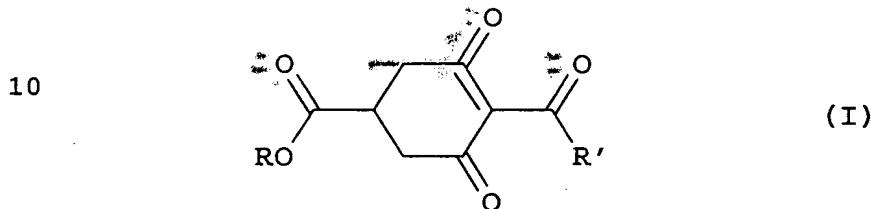
CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

Hiebinger

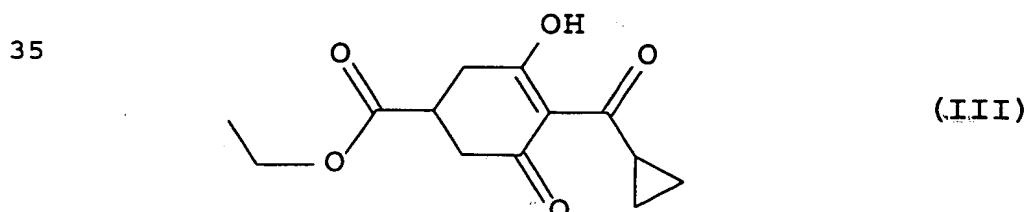
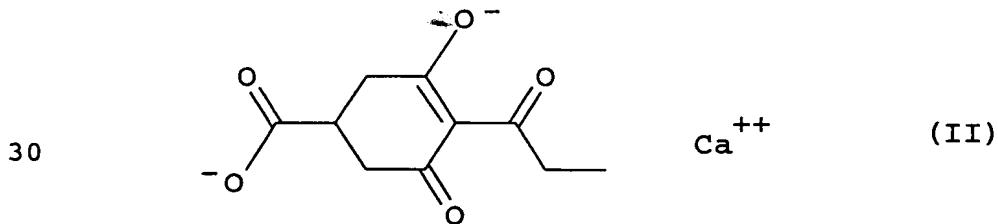
## Patentansprüche

1. Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und  
 5 phenolischen Inhaltsstoffen in Pflanzen, dadurch gekennzeich-  
 net, daß die Pflanzen mit wachstumsregulierenden Acylcyclohe-  
 xadionen der Formel I behandelt werden,



15 wobei R insbesondere für Wasserstoff, eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-,  
 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Haloalkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe  
 (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff,  
 eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert  
 20 oder unsubstituiert), Phenyethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienyl-  
 methyl-, Alkoxyethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht sowie  
 geeignete Salze dieser Verbindungen.

2. Verfahren gemäß Ansprüchen 1, bei dem die Erhöhung durch Be-  
 handlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca(I) und/  
 25 oder Trinexapac-ethyl(II) hervorgerufen werden.



40

3. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei den Pflanzen um Weinreben, Kirschen, Pflaumen, Schlehen, Blaubeeren, Erdbeeren, Zitrusfrüchten (wie Orangen, Grapefruit), Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch, Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, Aronia melanocarpa, Ginkgo biloba handelt.

10 4. Verwendung von Pflanzen gemäß Anspruch 3 oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellten Produkten (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika.

15 5. Mittel, hergestellt nach Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadiionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.

20 25 6. Mittel gemäß Anspruch 5, bei denen es sich um Trauben oder Traubenteilen, aus ihnen gewonnene Säfte, Weine oder Preßrückstände handelt oder um Extrakte aus den vorgenannten Trauben, Traubenteilen oder Traubenprodukten.

30

35

40

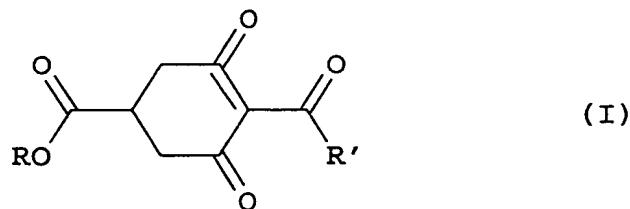
45

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen

5 Beschreibung

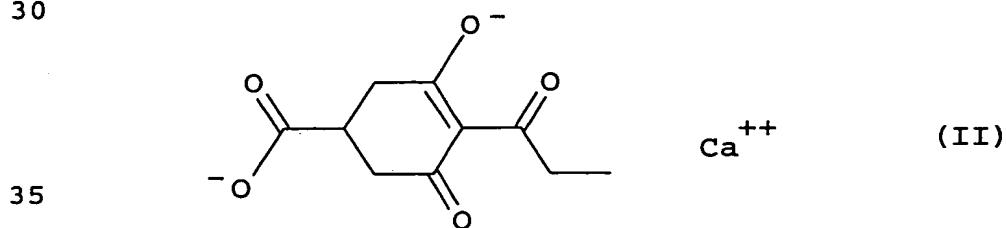
Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze mit 10 wachstumsregulierenden Acylcyclohexadionen der Formel I behandelt werden,

15

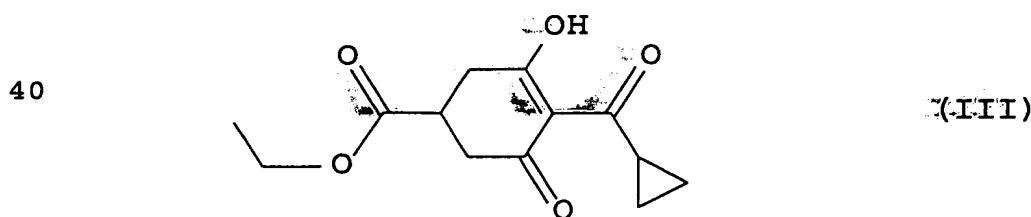


wobei R für insbesondere für Wasserstoff, eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Haloalkyl-, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-Alkylthioalkyl- oder Phenylgruppe (substituiert oder unsubstituiert) und R' für Wasserstoff, eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Cycloalkyl-, Benzyl- (substituiert oder unsubstituiert), Phenylethyl-, Phenoxyethyl-, 2-Thienylmethyl-, Alkoxyethyl- oder Alkylthiomethylgruppe steht, sowie geeignete 25 Salze dieser Verbindungen.

30



35



40

45 Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren mit Acylcyclohexadionen der Formel I, speziell Prohexadion-Ca oder mit Trinexapac-

ethyl behandelt wurden oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier 5 sowie von Kosmetika.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Mittel, hergestellt nach den erfindungsgemäßen Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, 10 deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen Inhaltsstoffen auszeichnen.

15

Verschiedene phenolische Substanzen (Phenylpropanoide) kommen in Pflanzen vor, z. B. Kaffeesäure, Ferulasäure, Chlorogensäure, Gallussäure, Eugenol, Lignane, Cumarine, Lignin, Stilbene (Polydatin, Resveratrol), Flavonoide (Flavone, Catechine, Flavanone, 20 Anthocyanidine, Isoflavone), polymethoxylierte Flavone. Demgemäß sind Phenole auch genereller Bestandteil vieler pflanzlicher Nahrungs- und Genußmittel. Bestimmte phenolische Substanzen sind von besonderer Bedeutung, da sie nach Aufnahme mit der Nahrung im menschlichen oder tierischen Stoffwechsel eine antioxidative Wirkung ausüben können (Baum, B. O.; Perun, A. L. Antioxidant efficiency versus structure. *Soc. Plast. Engrs Trans* 2: 250-257, 1962; Gardner, P.T.; McPhail, D.B.; Duthie, G.G. Electron spin resonance spectroscopic assessment of the antioxidant potential of teas in aqueous and organic media. *J. Sci. Food Agric.* 76: 25 257-262, (1997); Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 20: 933-956, (1996); Salah, N.; Miller, N. J.; Paganga, G.; Tijburg, L.; Bolwell, G. P.; Rice-Evans, C. Polyphenolic flavonoids as scavenger of aqueous 30 phase radicals and as chain-breaking antioxidants. *Arch Biochem Biophys* 322: 339-346, (1995); Stryer, L. *Biochemistry* S. Franciso: Freeman, (1975); Vieira, O.; Escargueil-Blanc, I.; Meilhac, O.; Basile, J. P.; Laranjinha, J.; Almeida, L.; Salvayre, R.; Negre-Salvayre, A. Effect of dietary phenolic compounds on apoptosis of human cultured endothelial cells induced by oxidized LDL. *Br J Pharmacol* 123: 565-573, (1998)). Darüber hinaus haben Polyphenole vielfältige Wirkungen auf den Zellstoffwechsel. Unter anderem werden Enzyme der Signaltransduction wie Proteinkinase C, Tyrosin-Proteinkinase und Phosphatidylinositol-3-kinase moduliert 40 45 (Agullo, G.; Gamet-payrastre, L.; Manenti, S.; Viala, C.; Remesy, C.; Chap, H.; Payrastre, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase: a compari-

son with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol* 53 :1649-1657, (1997); Ferriola, P. C.; Cody, V.; Midleton, E. Protein kinase C inhibition by plant flavonoids. Kinetic mechanisms and structure activity relationship. *Biochem Pharmacol* 38: 1617-1624, (1989); Cushman, M.; Nagarathman, D.; Burg, D. L.; Geahlen, R. L. Synthesis and protein tyrosine kinase inhibitory activity of flavonoids analogues. *J. Med. Chem.* 34: 798-806, (1991); Hagiwara, M.; Inoue, S.; Tanaka, T.; Nunoki, K.; Ito, M.; Hidaka, H. Differential effects of flavonoids as 10 inhibitors of tyrosine protein kinases and serine/threonine protein kinases. *Biochem Pharmacol* 37: 2987-2992, (1988)), die induzierbare NO-Synthase downreguliert (Kobuchi, H.; Droy-Lefaix, M. T.; Christen, Y.; Packer, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage 15 cell line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53: 897-903, (1997)) und die Genexpression von z. B. Interleukinen und Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1) reguliert (Kobuchi, H.; Droy-Lefaix, M. T.; Christen, Y.; Packer, L. *Ginkgo biloba* extract (EGb761): inhibitory effect on nitric oxide production in the macrophage cell 20 line RAW 264.7. *Biochem Pharmacol* 53: 897-903, (1997); Wolle, J.; Hill, R. R.; Ferguson, E.; Devall, L. J.; Triwedi, B. K.; Newton, R. S.; Saxena, U. Selective inhibition of Tumor necrosis Factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by a novel flavonoid. Lack of effect on transcriptional factor NF- $\kappa$ B. 25 *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 16: 1501-1508, (1996)). Es gilt als gesichert, daß diese Wirkungen positiv sind zur Prävention von Herz-Kreislauferkrankungen, Diabetes, verschiedener Tumorarten und weiterer chronischer Krankheiten (Bertuglia, S.; Malandrino, S.; Colantuoni, A. Effects of the natural flavonoid delphinidin 30 on diabetic microangiopathy. *Arznei-Forsch/Drug Res* 45: 481-485, (1995); Griffiths, K.; Adlercreutz, H.; Boyle, P.; Denis, L.; Nicholson, R.I.; Morton, M.S. *Nutrition and Cancer* Oxford: Isis Medical Media, (1996); Hertog, M. G. L.; Fesrens, E. J. M.; Hollman, P. C. K.; Katan, M. B.; Kromhout, D. Dietary antioxidant 35 flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet* 342: 1007-1011, (1993); Kapiotis, S.; Hermann, M.; Held, I.; Seelos, C.; Ehringer, H.; Gmeiner, B. M. Genistein, the dietary derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherosgenic LDL. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 17: 2868-74, (1997); Stampfer, M. J.; Hennekens, C. H.; Manson, J. E.; Colditz, G. A.; Rosner, B.; Willet, W. C. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *New Engl J Med* 328 :1444-1449, (1993); Tijburg, L. B. M.; Mattern, T.; Folts, J. D.; Weisgerber, 40 U. M.; Katan, M. B. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 37: 771-785, (1997); Kirk, E. A.; Sutherland, P.; Wang, S. A.; Chait, A.; LeBoeuf, R. C. Dietary

isoflavones reduce plasma cholesterol and atherosclerosis in C57BL/6 mice but not LDL receptor-deficient mice. *J Nutr* 128: 954-9, (1998)). Aus geeigneten Pflanzen wird daher bereits eine Reihe von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mit-  
5 teln gewonnen, deren Wirkung auf ihrem Gehalt an phenolischen Substanzen beruht (Gerritsen, M. E.; Carley, W. W.; Ranges, G. E.; Shen, C. P.; Phan, S. A.; Ligon, G. F.; Perry, C. A. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol* 147: 278-292, (1995); Lin, J. K.;  
10 Chen, Y. C.; Huang, Y. T.; Lin-Shiau, S. Y. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 28-29:39-48, 1997; Zi, X.; Mukhtar, H.; Agarwal, R. Novel cancer chemopreventive effects of a flavonoid  
15 antioxidant silymarin: inhibition of mRNA expression of an endogenous tumor promoter TNF alpha. *Biochem Biophys Res Comm* 239:334-339, 1997). Bekannt ist weiterhin, daß bestimmte pflanzliche Nahrungsmittel oder aus ihnen hergestellte Genußmittel eine positive Wirkung gegen verschiedene Krankheiten ausüben. Das in  
20 Weißwein, besonders aber in Rotwein, enthaltene Resveratrol (nebst weiterer Komponenten) wirkt beispielsweise gegen kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs (Gehm, B.D.; McAndrews, J.M.; Chien, P.-Y.; Jameson, J.L. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for estrogen receptor.  
25 *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 14138-14143, (1997); Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecher, C.W.W.; Fong, H.H.S; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, A.D.; Mehtha, R.G.; Moon, R.C., Pezzuto, J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275:  
30 218-220, (1997)). Eine ähnliche Wirkung weisen auch Substanzen wie Catechin, Epicatechin-3-gallat, Epigallocatechin und Epigallocatechin-3-gallat auf, die in Blättern von Tee (*Camellia sinensis*) vorkommen. Insbesondere aus nicht-fermentierten Teeblättern (Grüner Tee) hergestellte Getränke sind von positiver  
35 gesundheitlicher Relevanz (Hu, G.; Han, C.; Chen, J. Inhibition of oncogene expression by green tea and (-)-epigallocatechin gallate in mice. *Nutr Cancer* 24: 203-209; (1995); Scholz, E; Bertram, B. *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. Der Teestrauch. Z. *Phytotherapie* 17: 235-250, (1995); Yu, R.; Jiao, J. J.; Duh, J.  
40 L.; Gudehithlu, K.; Tan, T. H.; Kong, A. N. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant responsive elements-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis* 18: 451-456, (1997); Jankun, J.; Selman, S.H.; Swiercz, R. Why  
45 drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387: 561, (1997)). Darüber hinaus weisen auch polymethoxylierte Flavone aus Zitrusfrüchten eine potentielle antitumorale Wirkung auf (Chem,

J.; Montanari, A.M.; Widmer, W.W. Two new polymethoxylierte flavone, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerine peel oil solids. *J Agric Food Chem* 45: 364-368, (1997)).

5

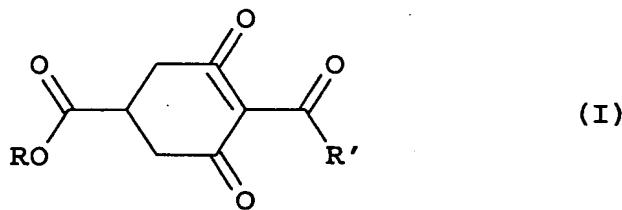
Acylcyclohexandione wie Prohexadion-Ca und Trinexapac-ethyl (ältere Bezeichnung: Gimectacarb) werden als Bioregulatoren zur Hemmung des pflanzlichen Längenwachstums eingesetzt. Ihre bioregulatorische Wirkung kommt dadurch zustande, daß sie die Bio-10 synthese von längenwachstumsfördernden Gibberellinen blockieren. Dabei hemmen sie aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu 2-Oxoglutarsäure bestimmte Dioxygenasen, die 2-Oxoglutarsäure als Co-Substrat benötigen (Rademacher, W, Biochemical effects of plant growth retardants, in: *Plant Biochemical Regulators*, Gaus-15 man, HW (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 169-200 (1991)). Es ist bekannt, daß derartige Verbindungen auch in den Stoffwechsel von Phenolen eingreifen und so bei mehreren Pflanzenarten eine Hemmung der Anthocyanbildung bewirken können (Rademacher, W et al., The mode of action of acylcyclohexanediones - a 20 new type of growth retardant, in: *Progress in Plant Growth Regulation*, Kanssen, CM, van Loon, LC, vreugdenhil, D (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1992)). Derartige Effekte auf den Haushalt phenolischer Inhaltsstoffe werden als ursächlich für die Nebenwirkung von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand angegeben (Rademacher, W et al., Prohexadion-Ca - a new plant growth regulator for apple with interesting biochemical features, Poster auf dem 25th Annual Meeting of the Plant Growth Regulation Society of America, 7.-10. Juli 1998, Chicago). A. Lux-Endrich (Dissertation Technische Universität München in Weihenstephan, 1998) findet im 25 Verlauf ihrer Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Prohexadion-Ca gegen Feuerbrand, daß es in Zellkulturen von Apfel durch Prohexadion-Ca zu einer mehrfachen Erhöhung des Gehaltes an phenolischen Substanzen kommt und daß dabei eine Reihe von sonst nicht vorhandenen Phenolen auftritt. Im Rahmen dieser Untersu-30 chungen wurde weiterhin gefunden, daß unter dem Einfluß von Prohexadion-Ca relativ hohe Mengen von Luteoliflavan und Eriodyctiol in Sproßgewebe von Apfel auftreten. Luteoliflavan kommt in Apfel-gewebe normalerweise nicht vor und Eriodyctiol tritt als Intermediat des Flavonoidstoffswechsels nur in geringen Mengen auf. Die 35 zu erwartenden Flavonoiden Catechin und Cyanidin waren im behan-delten Gewebe jedoch nicht nachweisbar oder traten nur in deutlich reduzierten Mengen auf (S. Römmelt et al, Vortrag 8th International Work- shop on Fire Blight, Kusadasi, Türkei, 12.-15. Ok-tober 1998).

Es kann als gesichert gelten, daß Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und andere Acylcyclohexandione 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxylasen inhibieren, die im Stoffwechsel phenolischer Substanzen von Bedeutung sind. Dabei handelt es sich primär um Chal-  
 5 consynthetase (CHS) und um Flavanon-3-hydroxylase (F3H) (W. Heller und G. Forkmann, Biosynthesis, in: The Flavonoids, Har-  
 borne, JB (ed.), Chapman and Hall, New York, 1988). Es kann je-  
 doch nicht ausgeschlossen werden, daß Acylcyclohexandione auch  
 10 weitere, bislang unbekannte, 2-Oxoglutarsäure-abhängige Hydroxy-  
 lasen hemmen. Es dürfte ferner naheliegend sein, daß ein Mangel  
 an Catechin, Cyanidin oder anderen Endprodukten der Flavonoid-  
 15 synthese von der Pflanze registriert wird und daß über einen Feedback-Mechanismus die Aktivität des Schlüsselenzyms Phenylala-  
 ninammoniumlyase (PAL) erhöht wird. Durch die weiterhin existie-  
 rende Hemmung von CHS und F3H können diese Flavonoid-Endprodukte jedoch nicht gebildet werden, und es kommt zu einer vermehrten Bildung von Luteoliflavan, Eriodyctiol und anderer Phenole (Ab-  
 20 bildung 1).

20 Aufgabe der Erfindung war es ein kostengünstiges, einfaches Ver-  
 fahren zu entwickeln, um den Gehalt an Flavonoiden und  
 phenolischen Verbindungen in Pflanzen zu erhöhen und um deren ge-  
 sundheitsfördernde Eigenschaften zu verbessern.

25 Die Aufgabe konnte überraschenderweise durch Behandlung der Pflanzen mit den wachstumsregulierenden Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexandione (I)

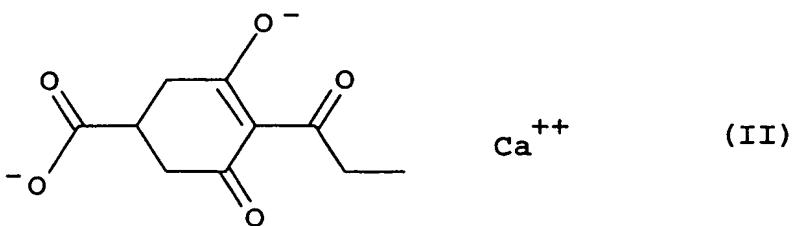
30



35

und vor allem mit den Verbindungen Prohexadion-Ca (II)

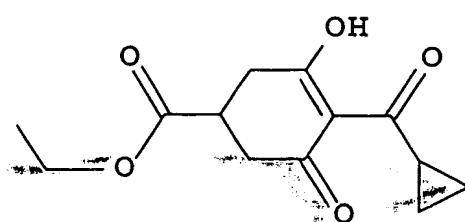
40



45

und Trihexapac-ethyl (III)

5



(III)

erreicht werden.

10

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Acylcyclohexadiionen der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trinexapac-ethyl(III) können die Flavonoide Eriodictyol, Proanthocyanidine, die am C-Atom 3 mit Wasserstoff substituiert sind, z.B. Luteoforol, Luteoliflavan, Apigeniflavan und Tricetiflavan, sowie homogene und heterogene Oligomere und Polymere aus den genannten und strukturell verwandten Substanzen vermehrt gebildet werden.

Erhöhte Konzentrationen der Phenole Hydroxyzimtsäuren (p-Cumaräure, Ferulasäure, Sinapinsäure), Salicylsäure oder Umbelliferon, einschließlich der aus ihnen gebildeten homogenen und heterogenen Oligomere und Polymere können nach Applikation der Verbindungen Acylcyclohexadiionen der Formel (I), Prohexadion-Ca(II) und Trihexapac-ethyl(III) auf Pflanzen festgestellt werden.

Durch die Behandlung der Pflanzen mit den Acylcyclohexadiionen der Formel I, Prohexadion-Ca(II) und Trinexapac-ethyl(III) wird auch die Konzentration der Glykoside der Flavonoide, der phenolischen Verbindungen, der Chalcone und der Stilbene in den Pflanzen erhöht.

Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl und verwandte Verbindungen greifen auch in weitere Stoffwechselreaktionen ein, bei denen bislang allenfalls vermutet werden kann, daß 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen beteiligt sind.

Als weitere zusätzlich positive Wirkung bei der Gewinnung von Präparaten aus höheren Pflanzen mit verbesserter heilender, gesundheitsfördernder oder stärkender Wirkung ist zu vermerken, daß sich aufgrund der wachstumsregulierenden Wirkung von Prohexadion-Ca, Trinexapac-ethyl oder verwandter Acylcyclohexandione ein Konzentrierungseffekt der relevanten Inhaltsstoffe im biologischen Material ergibt.

45

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erhöhung des Gehalts an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen durch Behandlung der Pflanzen mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadionen der Formel I, speziell Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl kann 5 erfolgreich bei folgenden Pflanzen angewendet werden, wobei auch Pflanzen, die nicht genannt sind, erfolgreich behandelt werden können: Weinreben, Kirschen, Pflaumen, Schlehen, Blaubeeren, Erdbeeren, Zitrusfrüchten (wie Orangen, Grapefruit), Papaya, Rotkohl, Broccoli, Rosenkohl, Grünkohl, Karotte, Petersilie, Sellerie, Zwiebeln, Knoblauch, Tee, Kaffee, Kakao, Maté, Hopfen, Soja, Raps, Hafer, Weizen, Roggen, Aronia melanocarpa, Ginkgo biloba handelt.

10 Pflanzen, die mit Verbindungen aus der Gruppe der Acylcyclohexadionen, speziell Prohexadion-Ca oder Trihexapac-ethyl behandelt wurden zur Steigerung des Gehaltes an Flavonoiden und phenolischen Verbindungen, oder von Teilen dieser Pflanzen oder aus ihnen hergestellte Produkte (Säfte, Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte und -rückstände) können zur Herstellung von heilenden, gesundheitsfördernden oder stärkenden Mitteln für Mensch und Tier sowie von Kosmetika verwendet werden.

15 Aus den erfindungsgemäß behandelten Pflanzen können auch Mittel hergestellt werden, die dadurch gekennzeichnet sind, daß Trauben von roten Weinreben gewonnen und verarbeitet werden, deren Anthocyanbildung durch Behandlung mit Acylcyclohexadionen wie Prohexadion-Ca oder Trinexapac-ethyl ganz oder teilweise unterbunden 20 worden ist und die sich daher durch einen qualitativ und quantitativ erhöhten Gehalt an Flavonoiden und anderen phenolischen 25 Inhaltsstoffen auszeichnen.

30 Es wurde nun überraschend gefunden, daß unter dem Einfluß von mit Acylcyclohexadionen der Formel I, Prohexadion-Ca oder Trihexapac-ethyl behandelten Pflanzen oder von Teilen dieser Pflanzen 35 oder aus ihnen hergestellten Produkten (Tees, Extrakte, Fermentationsprodukte, Säfte etc.)

- (1) die Antioxidative Kapazität *in vitro* (Electron Spin Resonance (ESR), LDL-Oxidation, Total Antioxidant Capacity, NO-Scavenging) verbessert wird;
- 40 (2) eine modulierende Wirkung auf Enzyme, vor allem Enzyme der Signaltransduktion (Proteinkinase C, Tyrosin-Proteinkinase, Phosphatidylinositol-3-Kinase) auftritt;

(3) eine Modulation redoxsensitiver Transkriptionsfaktoren (NF-  
kB, AP-1) in Endothelzellen, Lymphocyten und glatten Muskel-  
zellen induziert wird;

5 (4) die Regulation der Genexpression von Targetgenen involviert  
- in die Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen (Cytokine  
IL-1 und IL-8, Macrophage chemoattractant protein 1 (MCP-1),  
Adhesionsfaktoren (ICAM-1 und VCAM-1) moduliert wird.

10 (5) eine antiaggregatorische Wirkung induziert wird;

(6) die Cholesterinsynthese in Hepatocyten gehemmt wird;

(7) antiproliferative/antineoplastische Effekte bestehen.

15

#### Beispiel 1

Steigerung des Gehaltes an Eriodictyol und Luteoliflavan an jungen Apfelschalen nach Behandlung mit Prohexadion-Ca

20

Apfelpflanzen der Sorte "Weirouge" wurden unter Klimakammer-Bedingungen kultiviert und mit 250 ppm ~~an~~ Prohexadion-Ca (formuliert als BAS 125 10 W = 10%iges, benetzbares "Granulat") bis tropfnäss behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung wurde von den einzelnen Pflanzen das jeweils jüngste vollentwickelte Blatt geerntet. Die gefriergetrockneten und gemörserten Blätter wurden mit Methanol extrahiert. Aus dem konzentrierten Extrakt wurden Flavonoide und verwandte Verbindungen durch HPLC analysiert. Die Auftrennung erfolgte dabei an Hypersil ODS (3 µm Partikelgröße) auf einer Säule von 250 x 4 mm. Die Elution erfolgte bei einer Fließrate von 0,5 ml pro Minute, wobei Mischungen aus Ameisensäure (5 %ig in Wasser) und Methanol, schrittweise im Verhältnis von 95 : 5 bis 10 : 90 (v/v) gesteigert, verwendet wurden. Phenolische Säuren und Flavonole wurden bei 280 nm detektiert. Flavan-3-ole wurden nach Nachsäulenderivatisierung mit p-Dimethylaminozimtaldehyd bei 640 nm bestimmt. Methodische Details bei Treutter et al. (1994), *Journal of Chromatography A* 667, 290 - 297.

40 Das Ergebnis ist in folgender Tabelle dargestellt.

Blätter, die mit Prohexadion-Ca behandelt wurden zeigen eine deutliche Erhöhung der Eriodictyol-Konzentration nach 12 bzw. 21 Tagen.

45

10

Behandlung	Eriodictyol [g/kg Trockenmasse]		Luteoliflavan [g/kg Trockenmasse]	
	12 Tage n. Beh.	21 Tage n. Beh.	12 Tage n. Beh.	21 Tage n. Beh.
5 Kontrolle	0	1	0	70
250 ppm Prohexadion- Ca	17	27	0	34

## 10 Beispiel 2

Herstellung von Probenmaterialien aus behandelnden und unbehandelten Dornfelder-Trauben

15 Rebstöcke der Sorte "Dornfelder" wurden zweimal zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Formulierung BAS 125 10W, enthaltend Prohexadion-Ca behandelt. Je Behandlung wurden 1000 g Prohexadion-Ca in 1000 l Spritzbrühe pro ha appliziert.

20 Die 1. Ausbringung erfolgte im Entwicklungstadium 73 noch vor Beginn der Beerenausfärbung, die 2. Ausbringung 10 Tage später.

Bei der Ernte wiesen die unbehandelten und die behandelten Trauben einer ähnlichen Reifegrad auf. Kontrolle unbehandelt: 69°C Oe; 25 7,3 g/l Säurebehandelt: 67°C Oe; 7,4 g/l Säure.

Die behandelten Trauben waren geringer pigmentiert. Geschmacklich war kein Unterschied feststellbar.

30 Der Weinausbau erfolgte nach gängigen Methoden als Rotwein, d.h. zur besseren Pigmentextraktion stand der Most längere Zeit auf der Maische.

Nach Gefriertrocknung des trübungsfreien Weins wurden aus 100 ml 35 unbehandeltem Wein ca. 2,5 g sirupartiger Rückstand und aus dem mit Prohexadion-Ca behandelten Rebstöcken gewonnenen Wein ca. 2,1 g sirupartiger Rückstand gewonnen.

## Beispiel 3

40 Hemmung der Cholesterinbiosynthese in Kulturen primärer Rattenhepatocyten durch Prohexadion-Ca behandelten Dornfelder Wein

## Herstellung der Stammlösungen

Vom Lyophilisat der unbehandelten und behandelten Dornfelder Weine wurde eine Menge zwischen 10 und 20 mg exakt abgewogen und mit soviel DMSO versetzt, daß eine Stammlösung von 10 mM Gesamt-flavonoide entstand. Von diesen Stammlösungen wurden unmittelbar vor Testbeginn Verdünnungen im Kulturmedium hergestellt. Die Verdünnungen erfolgten in 10er Schritten zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-8}$  M.

## 10 Herstellung der Hepatocytenkulturen

Primäre Hepatocyten wurden aus den Lebern von männlichen Sprague-Dawley Ratten (240-290 g) mittels Collagenase-Perfusion gewonnen (Gebhardt et al., Arzneimittel-Forschung/Drug Res. 41: 800 -804 15 (1991) 1990). Die Kultivierung erfolgte in Collagen-beschichteten Petrischalen (6-well Plates, Greiner, Nürtingen) mit einer Zell-dichte von 125.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in Williams Medium E mit 10 % Kälberserum. Nähere Angaben insbesondere zum Kulturmedium finden sich bei Gebhardt et al., Cell Biol. Toxicol. 6: 369 - 372 20 (1990) und Mewes et al., Cancer Res. 53: 5135 - 5142 (1993). Die Kulturen wurden nach 2 h auf serum-freies Medium mit Zusatz von 0,1  $\mu$ M Insulin gewechselt. Sie wurden nach weiteren 20 h für die Versuche eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden in je drei unabhängigen Kulturen von 2-3 Ratten getestet.

25

## Inkubation der Leberzellkulturen mit den Testsubstanzen

Für den Nachweis einer Beeinflussung der Cholesterin-Biosynthese durch die Testsubstanzen wurden die Hepatocytenkulturen insgesamt 30 für 22 h gehalten. Anschließend wurde mit serum-freiem Williams Medium E unter Zusatz von  $^{14}\text{C}$ -Acetat (nur Tracermengen) für 2 h mit den Testsubstanzen in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Bei jeder Testserie wurde eine Kontrolle mitgeführt. Die Methodik ist bei Gebhardt (1991) und Gebhardt, Lipids 28: 613 35 -619 (1993) detailliert beschrieben. Die Tracermengen von  $^{14}\text{C}$ -Acetat tauschen schnell mit dem intrazellulären Acetyl-CoA Pool aus und ermöglichen deshalb eine störungsfreie Bestimmung des Einbaus von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in die Sterolfraktion, die zu >90 % aus Cholesterin besteht (Gebhardt, 1993).

40

## Analytik zur Beeinflussung der Cholesterin-Biosynthese

Der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in die Sterolfraktion (nicht-verseifbare Lipide) wurde nach Gebhardt (1991) gemessen. Bei der verwendeten 45 Extraktion mittels Extrelut®-Säulen (Merck, Darmstadt) wird das  $^{14}\text{C}$ -Acetat (und daraus in geringer Menge entstehende andere niedermolekulare Metabolite) zu mehr als 95 % abgetrennt. Dieser

12

Test kann vergleichende Angaben über die relative Syntheserate von Cholesterin und Vorläufer-Sterolen unter dem Einfluss von Testsubstanzen machen (Gebhardt, 1993).

## 5 Darstellung der Ergebnisse und Statistik

In den Abbildungen sind die gemessenen Werte als Mittelwerte  $\pm$  SD der Einzelversuche nach Normierung auf die Kontrollwerte (= 100 %) aufgetragen. Die statistische Bewertung erfolgte mit dem Student t-Test; als signifikant wurden Abweichungen mit p-Werten von <0,02 mit (\*) gekennzeichnet.

Visuelle und mikrobielle Überprüfung der Qualität der Hepatocytenkulturen

15

Alle verwendeten Kulturen wurden vor und nach der Testinkubation visuell am Mikroskop auf Kontamination mit Mikroorganismen und auf die Integrität der Zellmonolayer überprüft. Bei keiner der Proben wurde eine erkennbare Veränderung der Zellmorphologie (insbesondere bei den höheren Konzentrationen) beobachtet. Dies schließt eine Beeinflussung der Testergebnisse durch zytotoxische Wirkungen der Testsubstanzen weitgehend aus.

Die bei allen Kulturen routinemäßig durchgeführten Sterilitätschecks ergaben keinerlei Hinweise auf eine Kontamination mit Mikroorganismen.

## Ergebnisse

30 Der unbehandelte Dornfelder Wein zeigte keinerlei Wirkungen auf die Cholesterinbiosynthese. Dagegen wurde die Cholesterinsynthese durch Proben von mit Prohexadion-Ca behandelten Rebstöcken hergestelltem Wein signifikant inhibiert. Bei einer Konzentration von  $10^{-5}$  M betrug die Hemmwirkung ca. 60 % und bei  $10^{-4}$  M annähernd 35 100 %.

40

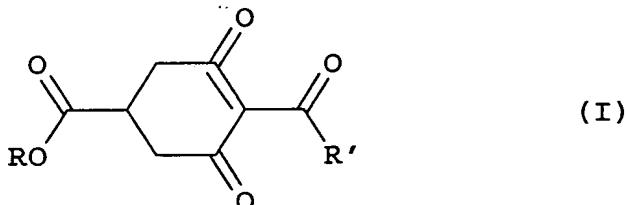
45

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Flavonoiden und phenolischen Inhaltsstoffen

5 Zusammenfassung

Verfahren zur Erhöhung des Flavonoid-Gehalts in Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanzen mit wachstumsregulierenden Acylcyclohexadienonen gemäß Formel I behandelt werden.

10



15

20

25

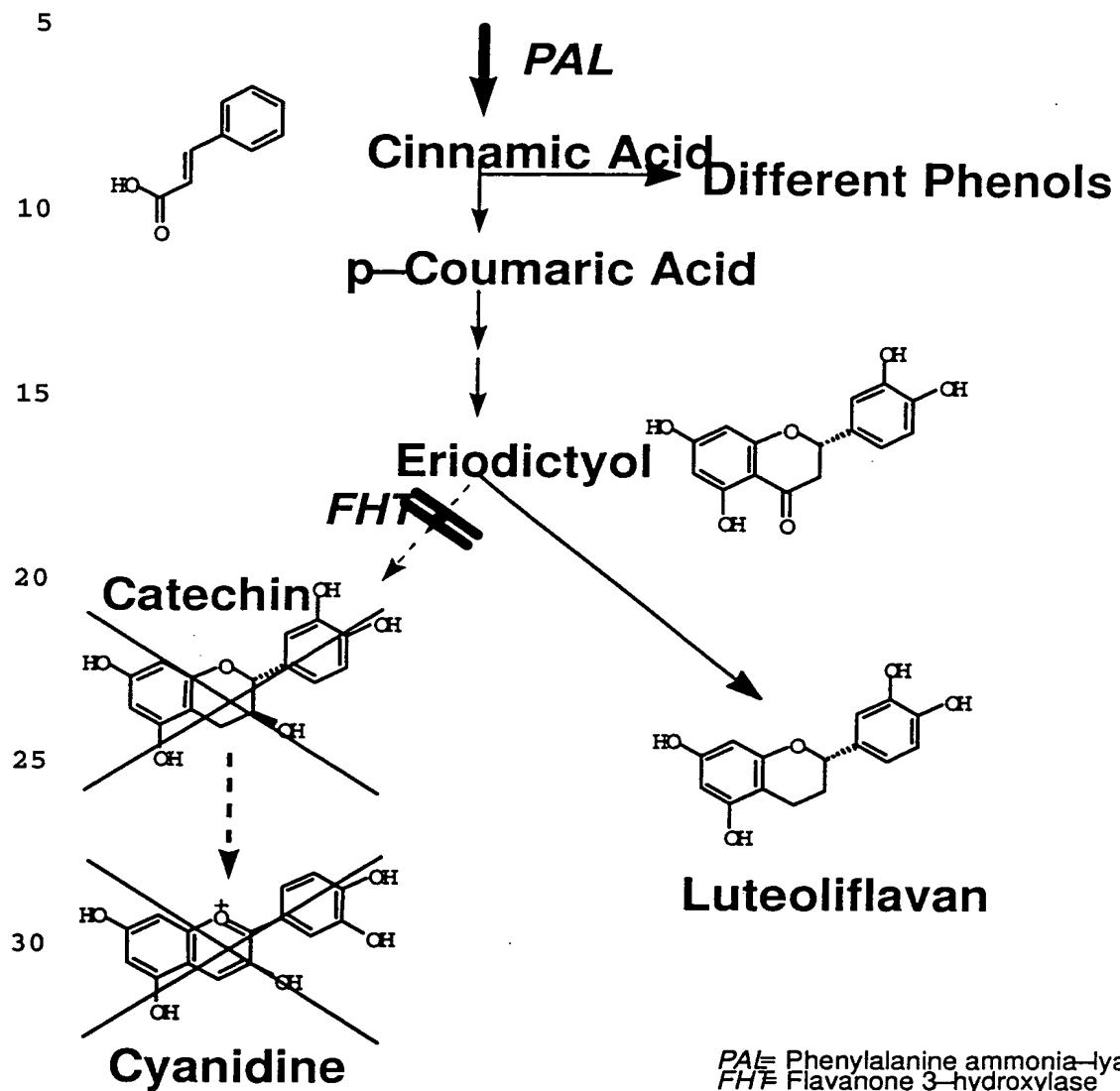
30

35

40

45

Abbildung 1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**